

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620101152301

UDC_____

廈門大學

硕 士 学 位 论 文

螺旋藻转座子转化体系的建立

Establish of the transposon transformation system of

Spirulina

杜正伟

指导教师姓名 : 章军 副教授

专 业 名 称 : 生物化学与分子生物学

论文提交日期 : 2013 年 06 月

论文答辩时间 : 2013 年 06 月

学位授予日期 : 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	I
ABSTRACT	III
前言.....	1
1. 藻类基因工程背景.....	1
2. 螺旋藻基因工程研究进展	4
3. 外源基因转移的载体系统	6
4. 转座子概述	12
5. 本研究的目的是和意义.....	15
材料与方法	17
1. 材料.....	17
2 实验方法	20
结果与分析	26
1. 蓝藻转座子转化载体的构建	26
2. 转座子载体 <i>egfp</i> 基因在大肠杆菌中的表达.....	32
3. 螺旋藻的转化及结果鉴定	33
4. 外源转座子转化载体在螺旋藻中的稳定性.....	38
5. 螺旋藻的复筛选	40
6. 同源整合载体与转座子转化载体系统的初步比较	44
讨论.....	47
1. 螺旋藻转座子转化体系的建立及转座元件的选择	47
2. 筛选标记与转化藻的纯化	49

3. 转座子转化体系的优势与不足	50
小结.....	52
展望.....	53
参考文献.....	54
致谢.....	62

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Catalogue

Abstract (Chinese version).....	I
Abstract (English version).....	III
Preface	1
1. Algal gene engineering background.....	1
2. Research progress of <i>Spirulina</i> engineering.....	4
3. Exogenous gene transfer vector.....	6
4. Introduction of transposon.....	12
5. Aims and significances of this research.....	15
Materials and methods	17
1. Materials.....	17
2. Methods	20
Results and analysis	26
1. Construction of transposon vector.....	26
2. Fluorescence expression of transposon vector in <i>E.coli</i>	32
3. Transformation and confirmation of <i>Spirulina</i>	33
4. Stability of <i>Spirulina</i> transposon vector.....	38
5. Compound screening of <i>Spirulina</i> transformants.....	40
6. Comparison of homologous integration vector and transposon transformation vector.....	44
Discussion	47
1. Establishment of transposon transformation system and selection of	

transposable element.....	47
2. Screening marker and purification of transformants.....	49
3. Advantages and disadvantages of transposon transformation system.....	50
Summary.....	52
Prospect.....	53
References	54
Acknowledgement	62

摘要

地球上藻类资源丰富并且多样，开发前景巨大。同时藻类分子遗传学不断飞速发展，使人们对藻类的研究更加深入。螺旋藻是一种古老而保守的蓝藻，因其营养成分丰富，并且应用广泛而备受亲睐。利用已经产业化的螺旋藻作为基因工程受体具有许多优点。但螺旋藻的基因工程研究比较缓慢，限制其发展的一个重要因素就是缺乏良好的转化系统。本文以蓝藻中的转座子为转座元件，以抗性基因和荧光标记基因为筛选标记，建立一种新的螺旋藻转化系统并且尝试转化螺旋藻，开发有效的螺旋藻转化平台。

转座子是广泛存在于生物体内可自由移动的一段 DNA 序列，可以通过切割、整合等过程将自身携带的基因片段转座到其他位置。首先在蓝藻基因组数据库中寻找合适的蓝藻转座子元件，设计引物并进行 PCR 扩增。分析发现，蓝藻简单插入序列（IS）同细菌简单插入序列结构类似。根据细菌转座子载体结构，将克隆的蓝藻 IS 序列分别连接到含有 *egfp* 标记基因，*npt* II 标记基因质粒的两端，构建人工转座子载体。以螺旋藻为宿主细胞，利用超声转化法将构建的转座子载体转入到螺旋藻中，结果显示含有蓝藻转座元件的载体转化成功。将其在不同品系螺旋藻中进行转化后成功得到转化子，证明该转座子载体在螺旋藻中适用的广谱性。

多细胞丝状体的螺旋藻给纯化子的筛选带来一定困难，本研究将 *egfp* 基因连入转座子转化载体，并且转化后能够稳定表达。利用高速分选流式细胞仪（FACS Vantage）技术，结合其他筛选方法，成功获得螺旋藻纯化转化藻株，有效避免了后续螺旋藻野生藻株的污染。这对于筛选丝状体的工程菌株提供了一定的参考。

以 *recA* 基因为整合位点的螺旋藻同源重组载体与转座子转化载体相比，两者在转化效率上差别不明显，但同源重组载体更适合线性化后转化，而转座子载体则刚好与之相反。并且在结果上，同源重组载体的转化子表型单一，转座子载体的转化子表型多样。

本研究首次利用蓝藻简单插入序列构建螺旋藻转座子转化载体，利用 *egfp* 基因检测转化结果，并在不同品系螺旋藻中转化获得成功，开辟了螺旋藻新的转化手段，改进了螺旋藻转化子的筛选方法，并比较了不同螺旋藻转化载体间

的差异，为进一步完善螺旋藻基因工程的研究工作奠定了基础。

关键词：螺旋藻；转化载体；转座子

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Algae are one of the most useful resources of the earth. And the rapid development of algal molecular genetics study has explored deeper research on the species. *Spirulina* is a kind of ancient and conserved algae which belongs to cyanobacteria. It gets more attention because of its rich nutrition and wide use. *Spirulina* has many advantages to be a genetic engineering host. However, the progress for genetic manipulation of *Spirulina* was still slowly, the major impeding factors is lack of a good transformation system. In this study, we established a new *Spirulina* transformation system with cyanobacteria transposon as the transposable elements, combined resistance gene and fluorescent gene as the selection marker, thus developed an effective transformation platform system for *Spirulina*.

Transposable elements are specific nucleotide sequence widely distributed in archaea, bacteria and eukarya organisms that can freely moved from one location to another location in the chromosomes by cutting and integrating process. First, we searched the cyanobacterial genome database and found the appropriate cyanobacteria transposon. Primers were designed and fragments were amplified by PCR. Analysis showed that cyanobacterial simple insertion sequence (IS) had the structure similar to bacterial insertion sequence. The artificial transposon vector of *Spirulina* was constructed based on bacterial transposon structure by connecting the cyanobacterial IS fragments with the plasmid contained *egfp* marker genes and *npt II* marker gene. Then using the ultrasonic method to transform transposon vector into *Spirulina*. The results showed that the transposon vector with cyanobacterial transposable element could be successfully transformed into different strains of spirulina, which indicated that the transposon vector could take effectively universally in *Spirulina*.

The multicellular filamentous character of *Spirulina* brings certain difficulties for screening and purificating the transformants. Using high-speed sorting of flow cytometry (FACS Vantage) technology, combined with other screening methods, we could purificate the transformants that effectively avoid the pollution of wild type strain in the next steps.

Compared the transposon vector with homologous recombination vector of *Spirulina*, we found that there was no significant difference on the transformation efficiency, Unlike homologous recombination vector to linearize for transformation, it was more suitable for transposon vector to non-linearize transform.

In this study, we firstly used blue green algae's insertion sequence to construct transposon transformation vector, detected the transformants by EGFP florescence, and successfully transformed in different strains of *Spirulina*. The new transformation method improved the efficiency for screening *Spirulina* transformants.

Keywords: *Spirulina*; transformation vector ; transposon

前言

1. 藻类基因工程背景

藻类是地球上最早的生物物种，广泛存在于地球上的各个角落，生态习性多样，其中绝大部分为水生，主要营养方式为光合自养。按照细胞的结构特点可以将其分为原核藻类和真核藻类，其中除蓝藻（blue-green algae）和原绿藻（*Prochloron didemni*）以外，基本上所有其他藻类都属于真核藻类。

1.1 藻类分子遗传研究概况

蓝藻也称蓝细菌（Cyanobacteria），是一类能进行植物型光合作用的原核生物，也是藻类中最原始的门类，兼具植物与细菌的一些特点。化石资料显示，蓝藻早在 20-35 亿年前就出现在地球上，是地球上第一个具有光合作用的有机体，约 150 属，2000 余种，适应性强，从寒冷的极地到极热的温泉都有发现。由于蓝藻的结构和遗传系统类似于革兰氏阴性菌，并且多数种类含有内源质粒，为构建有效转化系统提供了便利，所以蓝藻的基因工程发展很快。1970 年 Shestakov 与 Khyen 等首次发现蓝藻（*Synechococcus* sp. PCC7943）可以转化^[1]。自 1973 年 Asato 等首次证明蓝藻中含有质粒^[2]，已在约 50% 被检测单细胞及丝状蓝藻中证明了内源性质粒的存在，质粒数目从 1-10 个不等，大小在 1.3-130kb 之间。如 *Synechocystis* sp. PCC6803 含有 4-5 个质粒^[3, 4]。1975 年，Delaney 等利用 EMS 诱变技术建立了 *Anacystis nidulans* 的遗传图谱，推测蓝藻 DNA 复制可能从不止一个起点单向或双向进行^[5]。1989 年，Bancorft 等^[6]借助于脉冲均匀直变角凝胶电泳与 Southern 杂交技术，得到 *Anabaena* sp. PCC7120 的基因图谱，定位了 30 个基因探针，结果表明，蓝藻功能相关的基因并非集中在一处，而是分散在染色体上不同位置，其排列顺序与叶绿体基因组有较大差异。自 1980 年 Mazur 等人从淡水蓝藻 *Anabaena* sp. PCC7120 基因组中克隆到 *nif* H1（固氮酶）基因，一直以来蓝藻的研究始终处于整个藻类植物生物学的前沿，有些研究较多的蓝藻种类已成为分子生物学和基因工程研究中的重要模式生物。1996 年聚胞藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 作为第一个光合作用生物完成了基因组全序列测定，基因组序列全长 3,573,470 bp。其基因组资料在 1997 年正式集中公布，并分成 27 份收录在 DDBJ 里，序号从 D90899-D90915 和 D63999-D64006，以及 D90916，D90917。随后其他的一些基因组测序工作也相继完

成, 包括 *Anabaena* sp. PCC 7120, *Synechococcus* sp. PCC7942 等。蓝藻基因组克隆与基因组图谱绘制工作为蓝藻的基因操作奠定了坚实的基础。截止到目前, 蓝藻测序工作还在不断进行, 并且发展越来越快, 从 2012 年仅一年多的时间就有 30 多种蓝藻完成基因组测序工作 (表 1)。由于蓝藻在细胞结构、代谢、遗传和进化等方面表现出独特的性质, 多年来被广泛地应用于研究光合作用、固氮作用、叶绿体起源以及植物进化等重大生物学问题。目前, 蓝藻基因工程主要研究的内容包括基因的选择、鉴定、测序、序列分析与克隆, 载体的构建, 调控表达原件分析, 基因转化系统的发现和筛选, 转基因蓝藻的筛选及培养条件的优化等。自上世纪九十年代以来, 蓝藻已经形成了一套稳定的基因转化体系, 现已有多种外源基因在蓝藻中表达成功^[7-10]。

表 1 2012-至今完成测序的蓝藻物种

Table.1 The species whose genomes are sequenced (Last updated: March 7, 2013)

物种	参考序列号	长度 (bp)	质粒 (个)
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312	NC-019680	3697276	1
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7502	NC_019702	3510253	2
<i>Cyanobium gracile</i> PCC 6307	NC_019675	3342364	None
<i>Cyanobacterium aponinum</i> PCC 10605	NC_019776	4114099	1
<i>Cyanobacterium stanieri</i> PCC 7202	NC_019778	3163381	None
<i>Dactylococcopsis salina</i> PCC 8305	NC_019780	3781008	None
<i>Halotheca</i> sp. PCC 7418	NC_019779	4179170	None
<i>Gloeocapsa</i> sp. PCC 7428	NC_019745	5431448	4
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7502	NC_019702	3510253	2
<i>Cyanobium gracile</i> PCC 6307	NC_019675	3342364	None
<i>Cyanobacterium aponinum</i> PCC 10605	NC_019776	4114099	1
<i>Cyanobacterium stanieri</i> PCC 7202	NC_019778	3163381	None
<i>Chamaesiphon minutus</i> PCC 6605	NC_019697	6284095	2
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7107	NC_019676	6329823	None
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7524	NC_019684	6635030	2
<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122	NC_019771	6395836	6
<i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417	NC_019757	7003560	3

<i>Calothrix</i> sp. PCC 7507	NC_019682	7023215	None
<i>Calothrix</i> sp. PCC 6303	NC_019751	6767834	3
<i>Rivularia</i> sp. PCC 7116	NC_019678	8698463	2
<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7376	NC_019683	5125950	None
<i>Geitlerinema</i> sp. PCC 7407	NC_019703	4681111	None
<i>Oscillatoria acuminata</i> PCC 6304	NC_019693	7689443	2
<i>Oscillatoria nigro-viridis</i> PCC 7112	NC_019729	7479014	5
<i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 7367	NC_019701	4557046	1
<i>Crinalium epipsammum</i> PCC 9333	NC_019753	5315554	8
<i>Microcoleus</i> sp. PCC 7113	NC_019738	7470429	8
<i>Chroococcidiopsis thermalis</i> PCC 7203	NC_019695	6315792	2
<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7327	NC_019689	4986817	None
<i>Stanieria cyanosphaera</i> PCC 7437	NC_019748	5041209	5

资料来源: http://www.genome.jp/kegg/catalog/org_list.html

真核藻类 (Eukaryotic algae) 因其细胞结构复杂, 基因工程研究工作起步较晚, 但在各方面的研究中也已取得重大突破。1982年Rochaix等首先在单细胞绿藻莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 中进行真核藻类转化工作, 之后在1989年Kindle等报道其为叶绿体、线粒体与染色体三套基因组均能遗传转化的植物, 现今已成为研究真核藻类的模式生物^[11]。1991年Jarivs等用PEG法成功地将荧光素酶基因导入椭圆小球藻 (*Chlorella ellipsoidea*) 的原生质体中获得了瞬间表达, 小球藻已成为第二个成熟的单细胞绿藻转化系统。随着藻类基因工程的不断发展和高新技术在藻类中的应用, 藻类遗传背景不断完善, 已有多个藻种基因组已完成测序, 如硅藻 (*Thalassiosira pseudonana*)、三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*)、绿藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 等。目前, 已经有多个藻种实现了转化。这些藻种大多数实现了细胞核稳定转化, 有部分是瞬时转化, 有少数是叶绿体转化^[12]。

1.2 藻类作为基因工程研究对象的应用

藻类资源丰富, 开发前景巨大。在生态系统中占有重要地位, 是地球环境的碳循环、氮循环的主要参与者。同时藻类由于具有多样性、遗传结构独特性等特点, 已成为基因工程研究的理想材料, 藻类分子遗传学的飞速发展也为藻

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库